

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-228153

(43)Date of publication of application : 24.08.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 2000-036307

(71)Applicant : DAI ICHI PURE CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 15.02.2000

(72)Inventor : YAGO HIROKAZU

## (54) IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT METHOD

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make an immunological measurement method able to specifically, easily and quickly measure an antigen substance present in a sample.

SOLUTION: This immunological measurement method for antigen substance is characterized by reacting the antigen substance present in the sample, an insoluble carrier having an ion exchange functional group supported thereon, and an antibody in a reaction solution having pH and ion intensity such that no coagulation is caused by the combination of any two of the antigen substance, the insoluble carrier having the ion exchange functional group and the antibody, and selectively coagulating the insoluble carrier.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-228153

(P2001-228153A)

(43) 公開日 平成13年8月24日 (2001. 8. 24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 33/543	5 8 1	G 0 1 N 33/543	5 8 1 A
			5 8 1 C
	5 8 3		5 8 3

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-36307(P2000-36307)

(22) 出願日 平成12年2月15日 (2000. 2. 15)

(71) 出願人 390037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(72) 発明者 矢後 弘和

茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外4名)

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【解決手段】 抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないpH及びイオン強度を有する反応溶液中において、試料中に存在する抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体、及び抗体を反応させ、不溶性担体を選択的に凝集させることを特徴とする抗原物質の免疫学的測定方法。

【効果】 試料中に存在する抗原物質を特異的に、簡便かつ迅速に測定することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないpH及びイオン強度を有する反応溶液中において、試料中に存在する抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体、及び抗体を反応させ、不溶性担体を選択的に凝集させることを特徴とする抗原物質の免疫学的測定方法。

【請求項2】 抗体が、不溶性担体に担持されたものである請求項1記載の免疫学的測定方法。

【請求項3】 イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体を含み、抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないようにpH及びイオン強度が調整されていることを特徴とする、試料中に存在する抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体、及び抗体を反応させ、不溶性担体を選択的に凝集させて抗原物質を免疫学的に測定するための測定用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中の抗原物質を、凝集反応を利用して簡便かつ迅速に測定する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】病院、検査センター等においては、人員及び経費の削減に伴い、臨床検査の自動化、簡便化、測定時間の短縮化が図られている。ここで使用される汎用性の自動分析器に適用される免疫学的測定法としては、不溶性担体を利用して抗原物質を定性及び定量する凝集法で、主にラテックス凝集免疫測定法が用いられている。例えば、被検試料中に存在する抗原物質を測定する場合、試料と、抗原物質に特異的に反応する抗体又はそのフラグメントを担持させたラテックスとを混合して、凝集の程度を測定することにより、抗原物質を検出及び定量するものである。

【0003】ここで、抗体としては、抗原物質が、(1)特定のエピトープが1個である多価抗原物質の場合、(2)特定のエピトープが複数含まれる多価抗原物質の場合、(3)分子量の小さいハプテン等の1価の抗原物質である場合に、各抗原物質に適した測定方法や、抗体の特徴等に応じて、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体が使い分けられている。例えば、ポリクローナル抗体は、前記(1)、(2)及び(3)の抗原物質いずれにおいてもラテックス凝集免疫測定法に汎用されている。(1)及び(2)の抗原物質の場合、免疫凝集の増加で抗原物質が測定され、(3)の抗原物質の場合には、通常、ポリクローナル抗体と反応しても凝集は起こらないことから、ポリクローナル抗体と反応して凝集が生じる凝集素（例えば、ポリハプテン等）を用い、被検試料と反応させ、試料中の抗原物質がどの程度凝集を阻害したかを測定する

凝集阻害方法が汎用されている。しかし、ポリクローナル抗体は、抗体の作成において、使用する抗原に含まれるわずかの夾雑成分に対する抗体や、目的の抗原物質と構造が類似する他の成分と交差反応する抗体が含まれる場合があり、特異抗体に精製する段階での該抗体の損失も大きく、常に同じ品質のものを得ることは難しいという問題がある。

【0004】モノクローナル抗体を用いる方法として、抗原物質が(1)又は(2)の場合、2種又は3種のモノクローナル抗体を用いたラテックス凝集免疫測定法（特公平3-40341号）が知られている。しかし、各抗原物質に応じて、それぞれに特殊な2種又は3種のモノクローナル抗体を選択するのは困難であるという問題がある。また、(2)の抗原物質の場合、1種類のモノクローナル抗体を用いたラテックス凝集免疫測定法で測定が可能な場合があるが、特定のエピトープが複数含まれる特殊な抗原に限定される。更に、(1)及び(3)の抗原物質の場合、1種類のモノクローナル抗体では、通常、凝集は起こらないことから、ポリハプテン等の凝集素を用いる凝集阻害法が知られている。しかし、凝集素としてのポリハプテンが試料中のネイティブな抗原物質と同一の反応性を示す保証はなく、ポリハプテンと反応するモノクローナル抗体がネイティブな抗原物質と反応しない場合もあることから、ネイティブな抗原物質の反応性に近づけるための何らかの特殊な処理が必要になるという問題がある。

【0005】凝集阻害方法ではない、モノクローナル抗体を用いたラテックス凝集免疫測定法として、被検試料中の抗原物質を主に疎水結合により不溶性担体粒子に吸着させた後、該抗原物質に対する抗体を反応させて不溶性担体を選択的に凝集させる方法が知られている（特開平7-35752号）。しかし、この方法は、微量の生体成分や不溶性担体への吸着が困難な抗原物質の測定には適用し難く、また、不溶性担体に物理的に吸着した抗原物質は変性しやすいため、変性した抗原物質と特異的に反応する特殊な抗体を用いなければならないという問題がある。

【0006】更に、測定対象に対するモノクローナル抗体と、糖に対して親和性を有する物質とをそれぞれ担持した不溶性担体を検体と反応させて不溶性担体を選択的に凝集させる糖化タンパク質の測定方法が提案されている（特開平7-83921号）。しかし、生体成分中の糖化タンパク質の糖化度合いは一定でなく、特定の抗原物質に複数の糖化が生じるため、糖親和性物質結合不溶性担体と糖化タンパク質で凝集が生じ、抗原物質を特異的に測定できないという問題がある。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、試料中の抗原物質を特異的に、簡便かつ迅速に測定する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、イオン交換官能基を担持した不溶性担体を用い、反応溶液のpH及びイオン強度を調整することにより、試料中の抗原物質を特異的に、簡便かつ迅速に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないpH及びイオン強度を有する反応溶液中において、試料中に存在する抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体、及び抗体を反応させ、不溶性担体を選択的に凝集させることを特徴とする抗原物質の免疫学的測定方法を提供するものである。また、本発明は、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体を含み、抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないようにpH及びイオン強度が調整されていることを特徴とする、試料中に存在する抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体、及び抗体を反応させ、不溶性担体を選択的に凝集させて抗原物質を免疫学的に測定するための測定用試薬を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明において、測定の対象となる抗原物質としては、いずれかのpHの反応溶液中で電荷を有する物質であれば特に限定されず、臨床上測定意義の高い物質等を測定することができる。例えば、血液凝固線溶関連因子であるアンチトロンビンIII(ATIII)、トロンビン・ATIII複合体、フィブリン・フィブリノーゲン分解産物(FDP)、プラスミノノーゲン等；糖化タンパク質であるヘモグロビンA1c等；リポタンパク質であるアポAI、アポAII、アポB、アポE等；腫瘍マーカーであるCEA、AFP等；ホルモンであるHCG、LH、インスリン等；自己抗体であるRF、抗核抗体等；感染症で測定されるCRP、各種ウイルスの抗原(HBs等)、各種ウイルス・細菌に対する抗体(HBs抗体、HBe抗体、HCV抗体等)などが挙げられる。また、このような抗原物質が含まれる試料としては、血液、尿、唾液、細胞抽出液等が挙げられる。

【0011】本発明で用いる不溶性担体は、イオン交換官能基を担持したものである。不溶性担体の材質は特に制限されず、従来用いられている物質であればいずれでも良く、有機高分子物質、無機物質、細胞膜、血球、微生物等が挙げられる。有機高分子物質としては、ラテックス粒子が好ましく、特にアクリル酸重合体、スチレン重合体、メタクリル酸重合体等の樹脂の微粉末が1種又は2種以上均一に懸濁したラテックス粒子が好ましい。また、無機物質としては、シリカ、アルミナ等の微粒子が好ましい。さらに、不溶性担体としては、従来生体試料等からの物質の精製、定性分析、定量分析等のクロマ

トグラフィーで広く使用されているイオン交換体の担体である、高分子ポリマーのデキストラン、アガロース、セルロース、ポリスチレン等を使用することができる。また、このような担体にイオン交換体が結合された市販品等をそのまま、又は粒径等を調整して使用することもできる。

【0012】このような不溶性担体が担持するイオン交換官能基としては、従来生体試料等からの物質の精製、定性分析、定量分析等のクロマトグラフィーで広く使用されているイオン交換体の官能基であればいずれでも良く、例えば陽イオン交換官能基としては、酸性水酸基であるリン酸基等、カルボキシ基であるカルボキシメチル基等、スルホン基であるスルホメチル基、スルホプロピル基等の酸性基が挙げられ；陰イオン交換官能基としては、アミノ基であるジエチルアミノエチル基、トリメチルアミノメチル基、ジエチル（2-ヒドロキシプロピル）アミノエチル基等の塩基性基が挙げられる。イオン交換官能基の不溶性担体への担持方法は特に制限されず、例えばイオン交換官能基を不溶性担体に直接結合する、イオン交換官能基が適切なスペーサーを介して不溶性担体に結合する、イオン交換官能基をキャリアタンパク質に結合させたものを不溶性担体に結合する等の方法が挙げられる。これらの場合、結合方法は、化学的結合、物理的結合のいずれでも良い。

【0013】イオン交換官能基を担持した不溶性担体の粒径は特に制限されないが、生成した凝集体を光学的に測定する場合には、平均粒子径が1.6 $\mu$ m以下のものが好ましく、特に平均粒径が0.05~1 $\mu$ m、更に0.05~0.5 $\mu$ mのものが好ましい。また、凝集体を肉眼で観察する場合には、平均粒子径が1 $\mu$ m以上、特に1~20 $\mu$ mであるのが好ましい。

【0014】イオン交換官能基を担持した不溶性担体は、測定対象である抗原物質の電荷特性や、試料中の夾雑物質の電荷特性等を考慮して、適宜選択される。例えば、タンパク質（抗原物質）は両性電解質で、その総荷電はpHに依存し、タンパク質の等電点において総荷電は0になる。このとき、タンパク質は陰イオン及び陽イオン交換体のいずれとも結合しない。等電点より低いpHではタンパク質の総荷電は正になり、陽イオン交換体に結合し、等電点より高いpHではタンパク質の総荷電は負になり、陰イオン交換体に結合する。そして、タンパク質の等電点とpHの差が大きいほどイオン交換体に結合する力が強く、イオン強度が高くてもイオン交換体に結合できる。

【0015】また、イオン強度は、タンパク質がイオン交換官能基を担持した不溶性担体に結合し、かつ使用する抗体がイオン交換官能基を担持した不溶性担体に結合しない濃度に設定する。例えば、ATIII（抗原物質）の等電点は5.1（生化学データブックによる）であり、pH8.0では総荷電が負になり、陰イオン交換体

と結合できる。また、抗体は中性付近（ $\text{pH} 6 \sim 8$ ；抗体により異なる）が等電点であり、イオン強度を $\text{NaCl}$ で $0.1 \sim 0.2 \text{ M}$ にすることにより、イオン交換体と結合しなくなる。

【0016】本発明で用いる抗体としては、測定対象である抗原物質と特異的に結合し得るものであれば良く、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでも良い。ポリクローナル抗体の場合には、抗原物質との組み合わせでは、 $\text{pH}$ やイオン強度を調整しなくても凝集を起こさないものが好ましい。また、測定対象である抗原物質が、抗核抗体、抗HBs抗体等の抗体である場合には、これら抗体と特異的に結合し得る核酸、HBs等の抗原物質を用いることができる。本発明においては、抗原物質とイオン交換官能基を担持した不溶性担体とが、主に静電的に結合するため、抗原物質の変性が少なく、抗原に対する通常の抗体を用いることができる。

【0017】また、抗体は、遊離の抗体でも、不溶性担体に担持させた抗体でも良いが、測定感度の点から、不溶性担体に担持させた抗体が好ましい。抗体を不溶性担体に担持させる方法は特に制限されず、物理吸着、化学結合、免疫的結合等が挙げられる。また、抗体に対して結合性を有する物質を予め不溶性担体に担持させ、この物質を介して抗体を結合させる方法でも良い。なお、不溶性担体としては、前記のイオン交換官能基を担持するものと同様のものが挙げられ、特に有機高分子物質のラテックス粒子が好ましい。本発明においては、1種の抗体があれば良いが、より高感度の測定を行なうために、2種以上の抗体を用いることもできる。

【0018】本発明においては、抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないよう、反応溶液の $\text{pH}$ 及びイオン強度を調整する。 $\text{pH}$ の調整には、通常用いられる緩衝液、例えば酢酸、クエン酸、リン酸、トリス、グリシン、ホウ酸、炭酸、グッドの緩衝液等が用いられ、測定する抗原物質の等電点等に応じて使用される。また、イオン強度の調整には、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム等の電解質が用いられ、一般的には塩化ナトリウムが好ましい。

【0019】 $\text{pH}$ 及びイオン強度は、抗原物質の電荷特性（特に等電点等）や、用いるイオン交換官能基を担持した不溶性担体の種類、抗体等に応じて、設定すれば良い。例えば、後記の実施例のように、抗原物質としてATIIIを測定する場合、反応溶液の $\text{pH}$ は $\text{pH} 6 \sim 9$ 、イオン強度は塩化ナトリウム濃度で $0.1 \sim 0.2 \text{ M}$ となるように調整するのが好ましい。

【0020】本発明の測定方法は、前記のように $\text{pH}$ 及びイオン強度を調整した反応溶液中において、試料中に存在する抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体、及び抗体を反応させる。反応の際には、3成分が混合されたときに、所望の $\text{pH}$ 及びイオン強度になるよ

うに混合すれば良く、反応条件は測定する抗原物質や用いる抗体等により異なるが、一般に、室温 $\sim 37^\circ\text{C}$ 、 $1 \sim 20$ 分間の条件で行なうのが好ましい。なお、前記3成分が反応することにより、不溶性担体が選択的に凝集するが、抗原物質と不溶性担体との反応、抗原物質と抗体との反応は、同時に行なっても良いし、いずれかを先に行なっても良い。

【0021】凝集が起こった後、凝集の程度を測定する。凝集の程度を定性する場合は肉眼で観察すれば良く、定量する場合は凝集体を光学的に測定すれば良い。光学的な測定方法は、通常行われている方法であれば特に制限されず、汎用の分光光度計、分光光度測定を測定原理とした生化学用自動分析装置、近赤外を測定波長とした装置、積分球濁度を測定原理とした装置、散乱光強度を測定する装置等の光学的測定機器などを用いることができる。

【0022】本発明の測定試薬は、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体を含み、測定対象である抗原物質、イオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさないように $\text{pH}$ 及びイオン強度が調整されたものである。試薬は、1剤又は2剤以上の構成にすることができる。また、本発明の測定試薬は、測定対象となる試料と混合することにより使用され、試料中に存在する抗原物質と、試薬中のイオン交換官能基を担持した不溶性担体及び抗体が反応して凝集することにより、当該抗原物質を測定することができる。

【0023】

【発明の効果】本発明によれば、試料中に存在する抗原物質を特異的に、簡便かつ迅速に測定することができる。

【0024】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら制限されるものではない。

【0025】製造例1（抗ATIII固定化抗体溶液の調製）

抗ATIIIモノクローナル抗体が $1.4 \text{ mg/mL}$ の濃度になるように、 $0.25 \text{ M}$ グリシン緩衝液（ $\text{pH} 8$ ）と混合した溶液 $5 \text{ mL}$ に、平均粒径 $0.2 \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス（積水化学工業社製）の2重量%懸濁液 $5 \text{ mL}$ を加え、 $4^\circ\text{C}$ にて5時間攪拌した。次に、2%牛血清アルブミンを含む $50 \text{ mM}$ グリシン緩衝液（ $\text{pH} 8$ ） $10 \text{ mL}$ を加え、 $4^\circ\text{C}$ で一晩攪拌した。遠心洗浄により上清を除去した後、 $50 \text{ mM}$ グリシン緩衝液（ $\text{pH} 8$ ） $10 \text{ mL}$ を加えて良く混合し、抗ATIII固定化抗体溶液の原液を調製した。この原液を $20 \text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液（ $\text{pH} 8$ ）で $1/15$ に希釈して、抗ATIII固定化抗体溶液とした。

【0026】製造例2（陰イオン交換官能基を担持した

## 不溶性担体溶液の調製)

陰イオン交換樹脂であるDEAE-Sephacel (セルロースにジエチルアミノエチル基を担持させたもの; フェルマシア社製) を乳鉢にて磨り潰し、得られた細粒子 (平均粒径約  $10\mu\text{m}$ ) を  $20\text{mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH}8$ ) で  $1/10$  に希釈し、陰イオン交換官能基結合不溶性担体溶液とした。

## 【0027】実施例1 (ATIIIの測定)

製造例で得られた抗ATIII固定化抗体溶液、及び陰イオン交換官能基結合不溶性担体溶液、並びに  $1.67\text{M} \times 10$

\* 塩化ナトリウム水溶液、精製ATIII (アンスロンビンP、ヘキストジャパン社製) の  $1\text{mg/mL}$  溶液を用い、表1に示す割合で混合し、分光光度計を用いて  $600\text{nm}$  における  $15 \sim 75$  秒間の吸光度変化量を測定した。結果を表1に併せて示す。また、表1中の  $\text{pH}$  及びイオン強度は、各溶液を混合後の反応溶液のものである。

## 【0028】

## 【表1】

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
陰イオン交換官能基結合不溶性担体溶液	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$	—	$300\mu\text{L}$
抗ATIII固定化抗体溶液	—	$150\mu\text{L}$	$150\mu\text{L}$	—	$150\mu\text{L}$	$150\mu\text{L}$
$20\text{mM}$ トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH}8$ )	$150\mu\text{L}$	—	—	$150\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$	—
精製水	$50\mu\text{L}$	$50\mu\text{L}$	$20\mu\text{L}$	—	—	—
$1.67\text{M}$ NaCl	—	—	$30\mu\text{L}$	$30\mu\text{L}$	$30\mu\text{L}$	$30\mu\text{L}$
精製ATIII	—	—	—	$20\mu\text{L}$	$20\mu\text{L}$	$20\mu\text{L}$
$\text{pH}$	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
イオン強度 (NaCl濃度)	—	—	$0.1\text{M}$	$0.1\text{M}$	$0.1\text{M}$	$0.1\text{M}$
吸光度変化量 ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$ )	0.000	0.021	0.001	0.000	0.000	0.017

【0029】表1の結果より、イオン強度を調整していないNo.2では、吸光度変化量が  $0.021$  で、不溶性担体と抗体が反応していること示しており、この系で抗原物質を測定することはできない。No.3～5では、塩化ナトリウム溶液を加えてイオン強度を調整することに

より、不溶性担体、抗体及び抗原物質のうちのいずれか2つの組み合わせでは凝集を起こさない系が得られ、3成分を混合したNo.6では吸光度変化量が  $0.017$  で凝集が起こっており、この反応系において、抗原物質の測定ができることが確認された。